



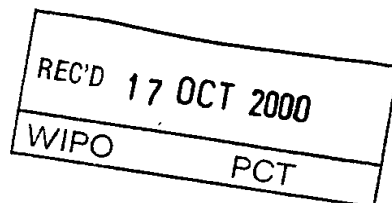
PCT/FR 00/02429

BREVET D'INVENTION

10/069883

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE



Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 21 SEP. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

24

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☒

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

- 1 SEP. 1999
9911141

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

47

01 SEP. 1999

DATE DE DÉPÔT

1 **NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET GERMAIN & MAUREAU
BP 6153

69466 LYON CEDEX 06

n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone
MD/MK/B05B3454FR 04.72.69.84.30

2 **DEMANDE** Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☐ demande initiale

☐ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

PROCEDE DE DETECTION DE L'EXPRESSION D'UNE PROTEINE D'ENVELOPPE D'UN RETROVIRUS
ENDOGENE HUMAIN ET UTILISATIONS D'UN GENE CODANT POUR CETTE PROTEINE.

3 **DEMANDEUR (S)** n° SIREN

code APE-NAF

Norm et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

BIO MERIEUX

Forme juridique

S.A.

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

Pays

Chemin de l'Orme
69280 MARCY L'ETOILE

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 **INVENTEUR (S)** Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 **RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES**

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 **DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE**

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 **DIVISIONS**

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 **SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**

(nom et qualité du signataire)

Mireille DIDIER
CPI 971202

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

D. GIRAUD

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

[Signature]

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDECATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR OU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
p. 17-18			X	07.03.00	15 MARS 2000 - V D

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

Les rétrovirus sont des virus enveloppés qui portent des spicules glycoprotéiques codées par les virus à leur surface. Ces glycoprotéines d'enveloppe sont synthétisées sous la forme de précurseurs polyprotéiques (Pré-env) qui sont ensuite clivés par des protéases cellulaires en protéine de surface mature (SU) et en protéine transmembranaire (TM). Les glycoprotéines d'enveloppe sont impliquées dans l'entrée des virus dans les cellules hôte. Elles reconnaissent spécifiquement et se lient à des récepteurs de surface cellulaire et sont nécessaires pour la fusion de l'enveloppe virale et des membranes cellulaires de l'hôte. Pour tous les virus enveloppés, les interactions des glycoprotéines d'enveloppe avec le ou les récepteur(s) cellulaire(s) conduisent à des réarrangements conformationnels de l'enveloppe nécessaires à l'exposition du peptide de fusion. La fusion a lieu à la surface de la cellule ou dans des vésicules cellulaires suivant la voie d'endocytose du virion. De plus, pour permettre l'entrée du virus, une fusion médiée par les protéines de surface virales peut, dans certaines conditions, provoquer une fusion cellule à cellule avec pour résultat la formation de cellules multinucléées géantes ou syncytia. La formation de syncytia est réalisée par au moins deux voies : un virion peut simultanément fusionner avec deux cellules, on parle alors de fusion « from without », ou une cellule infectée qui exprime les glycoprotéines d'enveloppe à sa surface peut fusionner avec une cellule adjacente (fusion « from within »).

Les déterminants de l'enveloppe et la séquence des événements causant les changements conformationnels de l'enveloppe lors des processus de fusion « from without » sont bien documentés pour les orthomyxovirus qui nécessitent un environnement acide des vésicules d'endocytose pour leur entrée (Skehel, J. J. et al., PNAS, 79 :968-972 (1982)). Pour les rétrovirus, pour lesquels la voie d'entrée est indépendante du pH, les déterminants précis et les étapes, menant de la reconnaissance du récepteur à l'activation de la fusion ne sont pas encore élucidés. D'autres rétrovirus sont connus pour induire une fusion cellule à cellule (« fusion from within »), tels que le virus de la leucémie féline, le virus de la tumeur mammaire de la souris, le virus de la réticuloendothéliose aviaire, VIH et SIV.

Par ailleurs, Fefferey S. Jones et Rex Risser (Journal of Virology, Janv. 1993, p 67-74) ont montré que les glycoprotéines d'enveloppe du virus de la leucémie murine écotrope (MuLV) de type sauvage, sous la dépendance du LTR viral, étaient capables d'induire la formation de syncytia dans des cellules de rat XC en l'absence de virion (fusion « from within »).

De la connaissance des inventeurs, il n'a jamais été montré de pouvoir fusogène, dans un processus de fusion « from within », des glycoprotéines d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain.

Des auteurs ont bien émis l'hypothèse que l'enveloppe rétrovirale endogène de ERV3, un rétrovirus endogène humain proche de MLV (Moloney Leukemia Virus), pouvait être impliquée *in vivo* dans l'élaboration du placenta via un processus de fusion (Patrick J. W. Venables et al., Virology, 211, 589-592 (1995)) mais ce phénomène n'a jamais été démontré *in vitro*. D'autre part, les études sur le polymorphisme de *env* ERV3, sur des individus d'origine caucasienne, ont permis de mettre en évidence la présence d'une mutation dans la région (SU) de l'enveloppe ERV3 générant un codon stop précoce présent à l'état homozygote dans 1% de la population étudiée, sans que ces individus présentent d'anomalie de la grossesse ou du développement placentaire (Nathalie de Parseval et Thierry Heidmann, Journal of Virology, Vol ; 72, N° 4, pages 3442-3445 (1998)).

Les présents inventeurs ont maintenant mis en évidence *in vitro* que la protéine d'enveloppe de HERV-W non modifiée, exprimée sous la dépendance d'un promoteur hétérologue possède des propriétés fusogènes.

HERV-W est une famille de rétrovirus endogènes humains multi-copie récemment décrite, dénommée ainsi en raison de l'homologie entre le site de fixation de l'amorce de la transcription inverse et celle des rétrovirus aviaires utilisant l'ARNt Trp. Aucune entité compétente pour sa réplication n'a été mise en évidence. La fonctionnalité d'une région promotrice a été vérifiée et, parmi différents tissus humains sains testés, son expression semble être restreinte au placenta (J. L Blond et al., Journal of Virology, Vol. 73, N° 2, pages 1175-1185 (1999)). Un cadre ouvert de lecture unique codant pour une enveloppe rétrovirale potentiellement fonctionnelle existe sur le chromosome 7. Un transcrit sous génomique portant la séquence de l'enveloppe complète a été isolé à partir de matériel placentaire (clone cl.PH74, GenBank AF072506, dont la séquence est identifiée par SEQ ID NO :1). Les études phylogénétiques effectuées au niveau protéique indiquent que la protéine d'enveloppe est de type D. La séquence SEQ ID NO :2 donnée en fin de description correspond à la séquence nucléotidique en ADNc complète du clone cl.PH74 dont la séquence protéique est identifiée par SEQ ID NO :1.

Env HERV-W possède tous les « attributs » d'une enveloppe rétrovirale : en particulier, un peptide leader, les deux sous unités caractéristiques SU et TM séparées par un site de clivage par les furines et, au niveau de sa TM, elle possède un peptide de fusion hydrophobe, une région immunosuppressive et une région carboxyl

transmembranaire suivie d'une queue cytoplasmique longue. L'expression de Env HERV-W a été mise en évidence dans le placenta.

Les expériences réalisées par les inventeurs montrent que Env HERV-W entraîne, par fusion de cellule à cellule, la formation de syncytia dans différentes lignées cellulaires testées d'origine humaine et simienne. Le phénomène de fusion observé est dépendant de la reconnaissance de récepteur(s) spécifique(s), comme montré de manière directe lors de transfections et de manière indirecte lors de co-cultures des cellules transfectées avec d'autres types cellulaires.

Aussi la présente invention a pour objet un procédé de détection de l'expression d'une protéine ou d'un polypeptide d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain, selon lequel la protéine ou le polypeptide présente une séquence polypeptidique qui comprend la séquence SEQ ID NO :1 ou un fragment de SEQ ID NO :1, ou une séquence présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 90% d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1 ou avec un fragment de SEQ ID NO :1, et selon lequel on détecte le pouvoir fusogène de ladite protéine ou dudit fragment dans des cellules d'un tissu cellulaire ou d'une culture cellulaire, par la mise en évidence de la formation de syncytia.

Un autre objet de l'invention est un procédé de détection de l'expression d'une protéine ou d'un polypeptide d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain, selon lequel la protéine ou le polypeptide présente une séquence polypeptidique présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 90% d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1, et selon lequel on détecte le pouvoir fusogène de ladite protéine dans des cellules d'un tissu cellulaire, ou d'une culture cellulaire par la mise en évidence de la formation de syncytia.

Selon l'invention, ladite protéine ou ledit polypeptide présente une séquence polypeptidique qui comprend la séquence SEQ ID NO :1 ou un fragment de SEQ ID NO :1, ou une séquence présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 80%, de préférence au moins 90%, ou encore au moins 95%, d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1 ou avec un fragment de SEQ ID NO :1.

Il est bien entendu selon la présente invention, que ladite protéine ou ledit polypeptide, ou leurs dits fragments, s'ils ne présentent pas une identité complète avec SEQ ID NO :1 ou ses fragments, doivent posséder un pouvoir fusogène, de préférence au moins égal ou supérieur à celui de SEQ ID NO :1 ou ses fragments.

Les variations prévues selon l'invention dans la séquence polypeptidique de la protéine ou du polypeptide ou de leurs fragments comprennent les variations liées au polymorphisme, mais aussi les modifications telles que substitution(s), délétion(s) et

addition(s) susceptibles d'être apportées à ladite séquence polypeptidique pour obtenir une protéine, un polypeptide ou un fragment de ceux-ci possédant un pouvoir fusogène, en particulier au moins égal ou supérieur à celui de SEQ ID NO :1 ou ses fragments.

Si les fragments de la protéine ou du polypeptide de l'invention présentent
 5 une identité complète avec les fragments de SEQ ID NO :1, alors la taille de ces fragments peut être inférieure à 20 acides aminés, par exemple elle peut être d'environ 10 acides aminés, voire d'environ 5 acides aminés.

De manière préférentielle, ladite protéine présente au moins l'une des caractéristiques suivantes :

- 10 - elle est codée par le gène *env* du rétrovirus endogène HERV-W ;
- elle est codée par un cadre de lecture ouvert situé sur le chromosome 7 du génome humain ;
- elle présente une séquence polypeptidique qui consiste en SEQ ID NO:1.

15 Les cellules dudit tissu ou de ladite culture cellulaire dans lesquelles on recherche à mettre en évidence le pouvoir fusogène sont avantageusement choisies parmi les cellules osseuses, les cellules musculaires, les cellules placentaires, les cellules endothéliales, en particulier des vaisseaux sanguins, les cellules épithéliales, les cellules gliales et les cellules tumorales ou issues de lignées cellulaires tumorales.

20 Comme cela sera illustré dans l'exemple qui suivra, la détection du pouvoir fusogène de ladite protéine peut être mise en œuvre selon au moins l'un quelconque des deux protocoles suivants.

Selon un premier protocole, on obtient un vecteur d'expression de ladite protéine à partir duquel l'expression de la protéine ou de son gène est sous la
 25 dépendance d'un promoteur ; on transfecte des cellules par le vecteur obtenu pour obtenir des cellules productrices, exprimant à leur surface ladite protéine ; et on observe la formation de syncytia ou l'absence de formation de syncytia.

Selon un second protocole, on obtient un vecteur d'expression de ladite protéine à partir duquel l'expression de la protéine ou de son gène est sous la
 30 dépendance d'un promoteur ; on transfecte des cellules par le vecteur obtenu pour obtenir des cellules productrices, exprimant à leur surface ladite protéine ; on cultive des cellules naïves indicatrices exprimant à leur surface un récepteur de ladite protéine en présence desdites cellules productrices ; et on observe la formation de syncytia ou l'absence de formation de syncytia.

35 La présente invention concerne en outre l'utilisation d'un gène ou d'un acide nucléique ou d'un fragment de gène ou d'un acide nucléique codant pour une

protéine ou un polypeptide tels que définis précédemment dans la description des procédés objets de l'invention, dans des conditions appropriées permettant son expression, pour préparer une composition thérapeutique ou prophylactique.

5 Un autre objet de l'invention est une composition thérapeutique ou prophylactique comprenant un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis précédemment.

10 Une telle composition peut comprendre en outre un promoteur hétérologue ou autologue, de préférence hétérologue, pour l'expression de ladite protéine ou dudit polypeptide.

L'invention concerne aussi les objets suivants :

- un vecteur d'expression comprenant au moins un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis précédemment, et des éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte ;
- 15 - une cellule hôte comprenant au moins un vecteur de l'invention, et
- une composition thérapeutique ou prophylactique comprenant au moins un vecteur d'expression ou une cellule hôte de l'invention.

20 Les différentes compositions thérapeutiques de l'invention sont en particulier destinée au traitement de cancers, tel que par destruction des cellules cancéreuses au moyen de la formation de syncytia. Les différentes compositions prophylactiques de l'invention sont notamment destinées à prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta.

25 Les compositions de l'invention sont avantageusement destinées à un traitement par thérapie génique.

L'invention concerne aussi un procédé pour la sélection de drogues ou substances médicamenteuses ou de systèmes gène/pro-drogue susceptibles d'intervenir qualitativement et/ou quantitativement sur le pouvoir fusogène d'une protéine ou d'un polypeptide tel que défini précédemment. Selon ce procédé, on met en contact ladite drogue ou substance médicamenteuse ou ledit système gène/pro-drogue avec des cellules d'une culture cellulaire exprimant ladite protéine ou ledit polypeptide et, on observe une régression ou une disparition dans la formation de syncytia.

35 Comme énoncé ci-dessus, les propriétés fusogènes de la protéine Env HERV-W, du polypeptide Env HERV-W ou de leurs fragments tels que définis dans la présente invention trouvent notamment une application dans le domaine de la thérapie génique des cancers.

A ce jour les gènes les plus fréquemment utilisés dans la thérapie contre les cancers sont (i) les gènes qui codent pour des protéines qui augmentent l'immunogénicité des cellules tumorales, telles que les cytokines pro-inflammatoires, (ii) les gènes qui codent pour des enzymes qui rendent les cellules cancéreuses sensibles à un pro-médicament dans des systèmes gène/pro-drogue, tels que le système thymidine kinase du virus Herpes Simplex/Ganciclovir ou le système cytosine désaminase/5FC.

De manière idéale, le transfert de gènes thérapeutiques devrait conduire à la fois à une destruction locale des cellules cancéreuses, à l'activation de l'immunité anti-tumorale pour éliminer les zones tumorales auxquelles les gènes thérapeutiques ne peuvent être délivrés et le traitement ne devrait pas causer de dommages aux tissus cellulaires normaux de l'hôte, en particulier aux tissus des organes vitaux.

La protéine ou le polypeptide de l'invention qui comprend ou consiste en la protéine Env HERV-W ou ses fragments, ou en une séquence polypeptidique présentant pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 90% d'identité avec SEQ ID NO :1, sous la dépendance d'un promoteur hétérologue ou autologue capable d'induire son expression répond aux critères définis ci dessus via la formation de syncytia. Ces syncytia se forment à partir de cellule(s) transfectée(s) par un processus de fusion de cellule à cellule.

Dans un mode de réalisation en vu d'optimiser ses caractéristiques thérapeutiques, le polypeptide de l'invention est éventuellement fusionné avec d'autres protéine(s) ou fragment(s) de protéine(s), même si intrinsèquement il répond aux critères définis précédemment. Le polypeptide de l'invention est capable d'induire la formation de syncytia à un pH voisin de la neutralité ou à pH neutre. Typiquement le vecteur d'expression ou plasmide sera adapté pour permettre l'expression du polypeptide induisant la formation de syncytia, de telle sorte que lorsqu'il est exprimé le polypeptide puisse induire la fusion des cellules transfectées avec d'autres cellules humaines non transfectées. Il est souhaitable que la protéine ou le polypeptide de l'invention soit exprimé indépendamment d'autres composants viraux, à moins que ceux ci soient utiles à la vectorisation.

Aussi, la présente invention a pour objet un gène ou un acide nucléique, ou un fragment de gène ou d'un acide nucléique, recombinant codant pour un polypeptide de l'invention qui induit la formation de syncytia par fusion de cellules transformées et de cellules malignes cibles et son utilisation dans le domaine de la thérapie de maladies malignes, telles que les cancers.

L'invention concerne également une méthode de traitement d'une maladie maligne chez un patient qui consiste à administrer au patient le gène ou un acide

nucléique, , ou un fragment de gène ou d'un acide nucléique, recombinant codant pour une protéine ou un polypeptide de l'invention qui induit la formation de syncytia par fusion de cellules transformées et de cellules malignes cibles.

Le gène ou l'acide nucléique, ou le fragment de gène ou d'acide nucléique
 5 est introduit *in vitro* dans des cellules humaines appropriées, telles que des cellules de lignées continues immortalisées, par des techniques standards connues de l'homme du métier, telle que transfection, transduction ou transformation, et les cellules ainsi transformées sont ensuite introduites chez le patient où elles peuvent exercer leur propriétés fusogènes.

10 Le gène ou l'acide nucléique, ou le fragment de gène ou d'acide nucléique de l'invention peut être utilisé de différentes manières pour le traitement de cancers, en particulier pour le traitement de tumeurs solides ou molles. Les cellules cibles peuvent être transformées *ex vivo* ou *in vivo* par les vecteurs (plasmides) codant pour le polypeptide de l'invention.

15 Les propriétés fusogènes de la protéine Env HERV-W, du polypeptide Env HERV-W ou de leurs fragments tels que définis dans la présente invention trouvent également une application dans le domaine de la prophylaxie pour prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta et pallier des échecs de grossesse.

Le gène ou l'acide nucléique ou leurs fragments tels que définis dans
 20 l'invention peuvent donc être utilisé pour différents effets thérapeutiques ou prophylactiques, le but ultime étant soit (i) de détruire les cellules cibles par formation de syncytia induisant une mort cellulaire des cellules cibles par un processus de mort différent de la mort cellulaire par apoptose, soit (ii) d'induire ou de favoriser la formation de syncytia, par exemple pour pallier une déficience dans la formation des
 25 syncytiotrophoblastes lors de la grossesse, ou pour prévenir une déficience dans la formation naturelle de tout autre type de syncytia, ladite déficience étant associée à une pathologie.

Les propriétés ou pouvoir fusogène(s) de la protéine ou du polypeptide de
 l'invention sont également utilisées dans un procédé pour tester l'efficacité et
 30 sélectionner des drogues ou substances médicamenteuses ou des systèmes gène/pro-drogue susceptibles d'intervenir qualitativement et/ou quantitativement sur leur pouvoir fusogène par mise en contact de ladite drogue ou substance médicamenteuse ou dudit système gène/pro-drogue avec des cellules d'une culture cellulaire exprimant ladit
 protéine ou ledit polypeptide et, observation d'une régression ou d'une disparition dans
 35 la formation de syncytia, étant entendu que la formation de syncytia à l'état naturel est associée à un état pathologique. A titre d'exemple, on peut citer les phénomènes

hémorragiques, la destruction ou l'altération des cellules neuronales, la destruction ou l'altération exacerbée des ostéoblastes.

Par gène ou acide nucléique ou leurs fragments, on entend (i) un gène ou acide nucléique natif isolé ou leurs fragments isolés obtenus par coupure enzymatique, ou (ii) un gène ou acide nucléique ou leurs fragments obtenu(s) par synthèse chimique à l'aide de synthétiseurs automatiques, tels que les synthétiseurs commercialisés par la société Applied Biosystems.

Par cellules tumorales, on entend (i) des cellules de lignées cellulaires immortalisées ou (ii) des cellules primaires tumorales prélevées chez un patient.

Par promoteur autologue, on entend un LTR 5' de HERV-W, à la condition qu'il soit fonctionnel et par promoteur hétérologue on entend tout promoteur n'appartenant pas à la famille de HERV-W, d'origine virale, rétrovirale ou cellulaire, éventuellement modifié, à la condition qu'il soit fonctionnel. Avantageusement, le promoteur autologue ou hétérologue est un promoteur fort c'est-à-dire qu'il est capable d'induire une expression quantitativement importante de la protéine ou du polypeptide.

Exemple :

Lignées cellulaires:

La lignée TELCeB6 (Cosset et al., Journal of Virology, 69 (12) : 7430-7436 (1995)) dérive de la lignée TELac2 après transfection et sélection clonale d'un plasmide d'expression destiné à produire des protéine Gag et Pol de type MoMLV (virus de la leucémie murine de Moloney). La lignée TELac2 dérive initialement des cellules humaines de rhabdomyosarcome TE671 (ATCC CRL 8805) et exprime le vecteur rétroviral rapporteur nlsLacZ (Takeuchi et al., Journal of Virology, 68 (12) : 8001-8007 (1994)). La production de particules rétrovirales infectieuses par les cellules TELCeB6 dépend des vecteurs d'expression d'enveloppe transfectés.

Ces cellules sont cultivées en milieu DMEM (Dulbecco modified Eagle medium - Life Technologies) avec 10% de sérum de veau foetal (Life Technologies). D'une manière générale, ce milieu a été utilisé pour tous les autres types cellulaires, *i.e.* les cellules A204 (ATCC HTB-82 - rhabdomyosarcome humain), A375 (ATCC CRL-1619 - tumeur solide, mélanome malin humain), A 431 (ATCC CRL-1555 - tumeur solide, carcinome épidermoïde humain), PAE (cellules endothéliales d'aorte de porc), TE671 (ATCC CRL 8805 - rhabdomyosarcome humain), XC (ATCC CCL-165 - sarcome de rat) et COS (ATCC CRL-1650 - rein de singe (African green monkey)).

Construction des vecteurs d'expression d'enveloppe :

Le plasmide pHCMV a été utilisé pour l'expression de *env* HERV-W. Le plasmide FBASALF-ARless a été utilisé en qualité de témoin positif de fusion; il produit une forme hautement fusogénique de la glycoprotéine d'enveloppe MLV amphotrope, modifiée par introduction d'un codon stop avant le premier acide aminé du peptide intracytoplasmique p2-R (Rein et al., Journal of Virology, 68 (3) : 1773-1781 (1994)). *env* HERV-W cloné en anti-sens dans le plasmide pHCMV a été utilisé comme témoin négatif.

Transfection et tests de fusion de cellule à cellule (coculture) :

Les plasmides d'expression des glycoprotéines d'enveloppe sont transfectés dans les cellules TELCeB6 par précipitation au phosphate de calcium (Cosset et al., Journal of Virology, 69 (10) : 6314-6322 (1995)). Les cellules TELCeB6 confluentes exprimant Env sont fixées au Glutaraldéhyde à 0,5% en PBS, 24 h. après transfection. Une coloration par des solutions de May-Grünwald et Giemsa (MERCK) est alors effectuée selon les recommandations du fournisseur. Elle colore les noyaux en violet et les cytoplasmes en mauve et permet de visualiser les syncytia.

Pour les expériences de coculture, les cellules transfectées sont décrochées du support, comptées puis ré-ensemencées à concentration égale (3×10^5 cellules/puit) en plaques 6 puits. Des cellules fraîches indicatrices sont alors ajoutées aux cellules transfectées à raison de 10^6 cellules par puit et la co-culture est poursuivie pendant 24 h. Une coloration XGal (5-bromo-4chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside peut alors être effectuée pour colorer le noyau des cellules TELCeB6 (Cosset et al., Journal of Virology, 69 (10) : 6314-6322 (1995)). Elle est suivie d'une coloration par des solutions de May-Grünwald et Giemsa (MERCK) effectuée selon les recommandations du fournisseur.

La majorité des syncytia est observable 18 à 24 heures après le début de la transfection ; le décollement progressif des cellules ne permet plus d'observation, ni de coloration 36 heures après la transfection. La fusion observée correspond à une fusion « from within », c'est-à-dire à une fusion de cellule-à-cellule, à partir d'une cellule exprimant l'enveloppe, par opposition à une fusion « from without » qui correspond à une formation de syncytia consécutive à une fusion virion-cellule(s).

Le tableau I ci-après rassemble les résultats obtenus concernant la capacité de fusion de cellule à cellule de Env HERV-W par transfection directe, comparée à

celle de l'enveloppe témoin Arless. Les cellules TELCeB6 et TE671 correspondent à des lignées d'origine humaine. Les cellules COS sont des cellules de rein de singe vert. Les cellules sont des cellules de rat.

Tableau I

5

Enveloppe	index ^a de fusion sur les cellules			
	TELCeB6	TE671	COS	XC
Arless	2,5	0,4	Inn.	2,0
HERV-W	10,0	2,0	0,08	0

^aL'index de fusion correspond au pourcentage $(N-S)/T$, où N est le nombre de noyaux en syncytia, S est le nombre de syncytia et T est le nombre total de noyaux comptés. inn. signifie innombrables, organisés en "réseau".

10

Le tableau I montre que les résultats sont au moins aussi importants pour Env HERV-W que pour le témoin sur les cellules d'origine humaine. Ils sont moindres sur les cellules simiennes. Env HERV-W n'induit pas la formation de syncytia sur des cellules de rat.

15

Le tableau II ci-après rassemble les données observées dans des expériences de coculture de cellules indicatrices avec des cellules TELCeB6 transfectées par pHCMV-*env* HERV-W. Le type, l'origine et l'espèce des cellules indicatrices sont indiqués. La formation de syncytia est indiquée par les mentions oui/non et semi-quantifié par des croix.

Tableau II

Espèce	Type cellulaire	Origine	Fusion en coculture avec TELCeB6
Homme	TE671	Rhabdomyosarcome	Oui ++
	A204	Rhabdomyosarcome	Non
	A375	Mélanome	Non
	A431	Carcinome	Oui ++
porc	PAE	épidermoïde	Non
rat	XC	Endothelium	Non
		Sarcome	

- 5 Le tableau II détaille les résultats des expériences de coculture en fonction des lignées cellulaires humaines testées. On observe des syncytia dans des cellules humaines de carcinome épidermoïde (A431) et de rhabdomyosarcome (TE671) ; on notera cependant qu'une autre lignée de rhabdomyosarcome (A204) ne présente pas de syncytia.

LISTE DE SEQUENCES

<110> BIO MERIEUX

5 <120> Procédé de détection de l'expression d'une protéine
d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain et
utilisations d'un gène codant pour cette protéine

10 <130> Pouvoir fusogène de env de ERV-W

<140>

<141>

<160> 2

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 538

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

25 Met Ala Leu Pro Tyr His Ile Phe Leu Phe Thr Val Leu Leu Pro Ser
1 5 10 15

Phe Thr Leu Thr Ala Pro Pro Pro Cys Arg Cys Met Thr Ser Ser Ser
20 25 30

30 Pro Tyr Gln Glu Phe Leu Trp Arg Met Gln Arg Pro Gly Asn Ile Asp
35 40 45

Ala Pro Ser Tyr Arg Ser Leu Ser Lys Gly Thr Pro Thr Phe Thr Ala
50 55 60

35 His Thr His Met Pro Arg Asn Cys Tyr His Ser Ala Thr Leu Cys Met
65 70 75 80

40 His Ala Asn Thr His Tyr Trp Thr Gly Lys Met Ile Asn Pro Ser Cys
85 90 95

Pro Gly Gly Leu Gly Val Thr Val Cys Trp Thr Tyr Phe Thr Gln Thr
100 105 110

45 Gly Met Ser Asp Gly Gly Gly Val Gln Asp Gln Ala Arg Glu Lys His
115 120 125

Val Lys Glu Val Ile Ser Gln Leu Thr Arg Val His Gly Thr Ser Ser
130 135 140

50 Pro Tyr Lys Gly Leu Asp Leu Ser Lys Leu His Glu Thr Leu Arg Thr
145 150 155 160

55 His Thr Arg Leu Val Ser Leu Phe Asn Thr Thr Leu Thr Gly Leu His
165 170 175

Glu Val Ser Ala Gln Asn Pro Thr Asn Cys Trp Ile Cys Leu Pro Leu
180 185 190

	Asn	Phe	Arg	Pro	Tyr	Val	Ser	Ile	Pro	Val	Pro	Glu	Gln	Trp	Asn	Asn
			195					200					205			
5	Phe	Ser	Thr	Glu	Ile	Asn	Thr	Thr	Ser	Val	Leu	Val	Gly	Pro	Leu	Val
		210					215					220				
	Ser	Asn	Leu	Glu	Ile	Thr	His	Thr	Ser	Asn	Leu	Thr	Cys	Val	Lys	Phe
	225					230					235					240
10	Ser	Asn	Thr	Thr	Tyr	Thr	Thr	Asn	Ser	Gln	Cys	Ile	Arg	Trp	Val	Thr
					245					250					255	
	Pro	Pro	Thr	Gln	Ile	Val	Cys	Leu	Pro	Ser	Gly	Ile	Phe	Phe	Val	Cys
15				260					265					270		
	Gly	Thr	Ser	Ala	Tyr	Arg	Cys	Leu	Asn	Gly	Ser	Ser	Glu	Ser	Met	Cys
			275					280					285			
20	Phe	Leu	Ser	Phe	Leu	Val	Pro	Pro	Met	Thr	Ile	Tyr	Thr	Glu	Gln	Asp
		290					295					300				
	Leu	Tyr	Ser	Tyr	Val	Ile	Ser	Lys	Pro	Arg	Asn	Lys	Arg	Val	Pro	Ile
	305					310					315					320
25	Leu	Pro	Phe	Val	Ile	Gly	Ala	Gly	Val	Leu	Gly	Ala	Leu	Gly	Thr	Gly
					325					330					335	
	Ile	Gly	Gly	Ile	Thr	Thr	Ser	Thr	Gln	Phe	Tyr	Tyr	Lys	Leu	Ser	Gln
30				340					345					350		
	Glu	Leu	Asn	Gly	Asp	Met	Glu	Arg	Val	Ala	Asp	Ser	Leu	Val	Thr	Leu
			355					360					365			
35	Gln	Asp	Gln	Leu	Asn	Ser	Leu	Ala	Ala	Val	Val	Leu	Gln	Asn	Arg	Arg
		370					375					380				
	Ala	Leu	Asp	Leu	Leu	Thr	Ala	Glu	Arg	Gly	Gly	Thr	Cys	Leu	Phe	Leu
	385					390					395					400
40	Gly	Glu	Glu	Cys	Cys	Tyr	Tyr	Val	Asn	Gln	Ser	Gly	Ile	Val	Thr	Glu
				405						410					415	
	Lys	Val	Lys	Glu	Ile	Arg	Asp	Arg	Ile	Gln	Arg	Arg	Ala	Glu	Glu	Leu
45				420					425					430		
	Arg	Asn	Thr	Gly	Pro	Trp	Gly	Leu	Leu	Ser	Gln	Trp	Met	Pro	Trp	Ile
			435					440					445			
50	Leu	Pro	Phe	Leu	Gly	Pro	Leu	Ala	Ala	Ile	Ile	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe
		450					455					460				
	Gly	Pro	Cys	Ile	Phe	Asn	Leu	Leu	Val	Asn	Phe	Val	Ser	Ser	Arg	Ile
	465					470					475					480
55	Glu	Ala	Val	Lys	Leu	Gln	Met	Glu	Pro	Lys	Met	Gln	Ser	Lys	Thr	Lys
					485					490					495	

Ile Tyr Arg Arg Pro Leu Asp Arg Pro Ala Ser Pro Arg Ser Asp Val
500 505 510

5 Asn Asp Ile Lys Gly Thr Pro Pro Glu Glu Ile Ser Ala Ala Gln Pro
515 520 525

Leu Leu Arg Pro Asn Ser Ala Gly Ser Ser
530 535

10

<210> 2

<211> 2781

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 2

20 atgggagctg ttttcatgct atttcactct attaaatctt gcaactgcac tcttctggtc 60
catgtttctt acggctcgag ctgagctttt gctcaccgtc caccactgct gtttgccacc 120
accgcagacc tgccgctgac tcccatccct ctggatcctg cagggtgtcc gctgtgctcc 180
tgatccagcg aggcgcccct tgccgctccc aattgggcta aaggcttgcc attgttccctg 240
cacggctaag tgccctgggtt tgttctaatt gagctgaaca ctagtcaact gggtccatgg 300
ttctcttctg tgaccacagg cttctaatag aactataaca cttaccacat ggccaagat 360
tccattcctt ggaatccgtg aggccaaaga ctccagggtc gagaatacga ggcttgccac 420
25 catcttgga ggcgcctgct accatcttgg aagtgggtca ccaccatctt gggagctctg 480
tgagcaagga ccccccggtt acattttggc aaccacgaac ggacatccaa agtgatacat 540
cctgggaagg accctaccca gtcattttat ctaccccaac tgcggttaaa gtggctggag 600
tgaggtcttg gatacatcac acttgagtca aatcctggat actgccaag gaacctgaaa 660
atccaggaga caacgctagc tattcctgtg aacctctaga ggatttgccg ctgctcttca 720
30 aacaacaacc aggaggaag taactaaaat cataaatccc catggccctc ctttatcata 780
tttttctctt tactgttctt ttacctctt tcaactctac tgcacccctc ccatgccgct 840
gtatgaccag tagctccctt taccaagagt ttctatggag aatgcagcgt cccggaata 900
ttgatgcccc atcgtatagg agtctttcta agggaaacccc caccttcaact gccacacccc 960
atatgccccg caactgctat cactctgcca ctctttgcat gcatgcaaat actcattatt 1020
35 ggacaggaaa aatgattaat cctagtgtgc ctggaggact tggagtcact gtctgttgga 1080
cttacttcac ccaaactggt atgtctgatg ggggtggagt tcaagatcag gcaagagaaa 1140
aacatgtaaa agaagtaatc tcccaactca cccgggtaca tggcacctct agcccctaca 1200
aaggactaga tctctcaaaa ctacatgaaa cctccgtac ccatactcgc ctggttaagcc 1260
tatttaatac caccctcact gggctccatg aggtctcggc ccaaaaccct actaactgtt 1320
40 ggatatgcct cccctgaac ttcaggccat atgtttcaat ccctgtacct gaacaatgga 1380
acaacttcag cacagaaata aacaccactt ccgttttagt aggacctctt gtttccaatc 1440
tggaataaac ccatacctca aacctcacct gtgtaaaatt tagcaatact acatacaca 1500
ccaactccca atgcatcagg tgggtaactc ctcccacaca aatagtctgc ctaccctcag 1560
gaatattttt tgtctgtggt acctcagcct atcgttggtt gaatggctct tcagaatcta 1620
45 tgtgcttctt ctcatcttta gtgcccccta tgaccatcta cactgaacaa gatttataca 1680
gttatgtcat atctaagccc cgcaacaaaa gagtacccat tcttcctttt gttataggag 1740
cgggagtgtc aggtgcacta ggtactggca ttggcggtat cacaacctct actcagttct 1800
actacaaact atctcaagaa ctaaatggg acatggaacg ggctcgccgac tccctgggtc 1860
ccttgcaaga tcagcttaac tccctagcag cagtagtctt tcaaaatcga agagcttttag 1920
50 acttgctaac cgctgaaaga gggggaacct gtttattttt aggggaagaa tgctgttatt 1980
atgttaatca atccggaatc gtcactgaga aagttaaaga aattcgagat cgaatacaac 2040
gtagagcaga ggagcttcga aacactggac cctggggcct cctcagccaa tggatgccct 2100
ggattctccc cttcttagga cctctagcag ctataatatt gctactctc tttggacctt 2160
gtatctttta cctccttgtt aactttgtct cttccagaat cgaagctgta aaactacaaa 2220
55 ttgagcccaa tgagcagtc aagactaaga tctaccgcag acccctggac cggcctgcta 2280
gccacgatac tgatgttaat gacatcaaag gcacccctcc tgaggaaatc tcagctgcac 2340
aacctctact acgccccaat tcagcaggaa gcagtttagag cggtcgtcgg ccaacctccc 2400
caacagcact taggttttcc tgttgagatg ggggactgag agacaggact agctggattt 2460

cctaggctga ctaagaatcc ctaagcctag ctgggaaggt gaccacatcc acctttaaac 2520
acggggcttg caacttagct cacacctgac caatcagaga gctcactaaa atgctaatta 2580
ggcaaagaca ggaggtaaag aaatagccaa tcatctattg cctgagagca cagcaggagg 2640
gacaatgac ggatataaa cccaagtctt cgagccggca acggcaaccc cctttgggtc 2700
5 cctcccttt gtatgggagc tctgttttca tgctatttca ctctattaaa tcttgcaact 2760
gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 2781

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection de l'expression d'une protéine ou d'un polypeptide d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain, caractérisé en ce que la protéine ou le polypeptide présente une séquence polypeptidique qui comprend la séquence SEQ ID NO :1 ou un fragment de SEQ ID NO :1 ou une séquence présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 90% d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1 ou avec un fragment de SEQ ID NO :1, et en ce qu'on détecte le pouvoir fusogène de ladite protéine ou dudit fragment dans des cellules d'un tissu cellulaire ou d'une culture cellulaire, par la mise en évidence de la formation de syncytia.
2. Procédé de détection de l'expression d'une protéine ou d'un polypeptide d'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain, caractérisé en ce que la protéine ou le polypeptide présente une séquence polypeptidique présentant, pour toute suite de 20 acides aminés, au moins 90% d'identité avec la séquence SEQ ID NO:1, et en ce qu'on détecte le pouvoir fusogène de ladite protéine dans des cellules d'un tissu cellulaire, ou d'une culture cellulaire par la mise en évidence de la formation de syncytia.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la protéine est codée par le gène *env* du rétrovirus endogène HERV-W.
4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la protéine est codée par un cadre de lecture ouvert situé sur le chromosome 7 du génome humain.
5. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la protéine présente une séquence polypeptidique qui consiste en SEQ ID NO:1.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les cellules dudit tissu ou de ladite culture cellulaire sont choisies parmi les cellules osseuses, les cellules musculaires, les cellules placentaires, les cellules endothéliales, en particulier des vaisseaux sanguins, les cellules épithéliales, les cellules gliales et les cellules tumorales ou issues de lignées cellulaires tumorales.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la détection du pouvoir fusogène de ladite protéine consiste à :
 - obtenir un vecteur d'expression de ladite protéine à partir duquel l'expression de la protéine ou de son gène est sous la dépendance d'un promoteur,
 - transfecter des cellules par le vecteur obtenu pour obtenir des cellules productrices, exprimant à leur surface ladite protéine, et
 - observer la formation de syncytia ou l'absence de formation de syncytia.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que la détection du pouvoir fusogène de la protéine consiste à :

obtenir un vecteur d'expression de ladite protéine à partir duquel l'expression de la protéine ou de son gène est sous la dépendance d'un promoteur, transférer des cellules par le vecteur obtenu pour obtenir des cellules productrices, exprimant à leur surface ladite protéine,

- 5 cultiver des cellules naïves indicatrices exprimant à leur surface un récepteur de ladite protéine en présence desdites cellules productrices, et observer la formation de syncytia ou l'absence de formation de syncytia.

9. Utilisation d'un gène ou d'un acide nucléique ou d'un fragment de gène ou d'un acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis
10 dans la revendication 1 ou 2, dans des conditions appropriées permettant son expression, pour préparer une composition thérapeutique ou prophylactique.

10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que ladite composition est destinée au traitement de cancers.

11. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en, ce que ladite
15 composition est destinée à prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta.

12. Utilisation selon la revendication 9, 10 ou 11, caractérisée en ce que la composition est destinée à un traitement par thérapie génique.

13. Composition thérapeutique ou prophylactique comprenant un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une
20 protéine ou un polypeptide tels que définis dans la revendication 1 ou 2,

14. Composition selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un promoteur hétérologue ou autologue, de préférence hétérologue, pour l'expression de ladite protéine ou dudit polypeptide.

15. Vecteur d'expression comprenant au moins un gène ou un acide
25 nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis dans la revendication 1 ou 2, et des éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte.

16. Cellule hôte comprenant au moins un vecteur selon la revendication
15.

30 17. Composition thérapeutique ou prophylactique comprenant au moins un vecteur d'expression selon la revendication 15.

18. Composition selon l'une quelconque des revendications 12, 13, 14, et 17, caractérisée en ce qu'elle est destinée au traitement de cancers par destruction des cellules cancéreuses au moyen de la formation de syncytia.

19. Composition selon l'une quelconque des revendications 12, 13, 14, et 17, caractérisée en ce qu'elle est destinée à prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta.

20. Procédé pour la sélection de drogues ou substances médicamenteuses
5 ou de systèmes gène/pro-drogue susceptibles d'intervenir qualitativement et/ou quantitativement sur le pouvoir fusogène d'une protéine ou d'un polypeptide tel que défini dans la revendication 1 ou 2, selon lequel on met en contact ladite drogue ou substance médicamenteuse ou ledit système gène/pro-drogue avec des cellules d'une culture cellulaire exprimant ladite protéine ou ledit polypeptide et, on observe une
10 régression ou une disparition dans la formation de syncytia.

obtenir un vecteur d'expression de ladite protéine à partir duquel l'expression de la protéine ou de son gène est sous la dépendance d'un promoteur,

transfecter des cellules par le vecteur obtenu pour obtenir des cellules productrices, exprimant à leur surface ladite protéine,

- 5 cultiver des cellules naïves indicatrices exprimant à leur surface un récepteur de ladite protéine en présence desdites cellules productrices, et observer la formation de syncytia ou l'absence de formation de syncytia.

9. Utilisation d'un gène ou d'un acide nucléique ou d'un fragment de gène ou d'un acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis dans la revendication 1 ou 2, dans des conditions appropriées permettant son expression, pour préparer une composition thérapeutique ou prophylactique.

10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que ladite composition est destinée au traitement de cancers.

11. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que ladite composition est destinée à prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta.

12. Utilisation selon la revendication 9, 10 ou 11, caractérisée en ce que la composition est destinée à un traitement par thérapie génique.

13. Composition thérapeutique ou prophylactique comprenant un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis dans la revendication 1 ou 2,

14. Composition selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un promoteur hétérologue ou autologue, de préférence hétérologue, pour l'expression de ladite protéine ou dudit polypeptide.

15. Vecteur d'expression comprenant au moins un gène ou un acide nucléique ou un fragment de gène ou d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que définis dans la revendication 1 ou 2, et des éléments nécessaires à son expression dans une cellule hôte.

16. Cellule hôte comprenant au moins un vecteur selon la revendication 15.

17. Composition thérapeutique ou prophylactique comprenant au moins un vecteur d'expression selon la revendication 15.

18. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 13, 14, et 17, caractérisée en ce que ladite composition est destinée au traitement de cancers par destruction des cellules cancéreuses au moyen de la formation de syncytia.

19. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 12, 13, 14, et 17, caractérisée en ce que ladite composition est destinée à prévenir une déficience dans l'élaboration du placenta.

20. Procédé pour la sélection de drogues ou substances médicamenteuses
- 5 ou de systèmes gène/pro-droque susceptibles d'intervenir qualitativement et/ou quantitativement sur le pouvoir fusogène d'une protéine ou d'un polypeptide tel que défini dans la revendication 1 ou 2, selon lequel on met en contact ladite drogue ou substance médicamenteuse ou ledit système gène/pro-droque avec des cellules d'une culture cellulaire exprimant ladite protéine ou ledit polypeptide et, on observe une
- 10 régression ou une disparition dans la formation de syncytia.